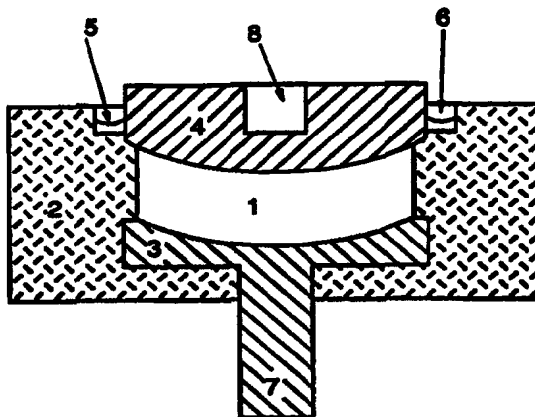


**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>G01N 33/483, C12M 1/00, G01N 1/28</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/28742</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 10. Juni 1999 (10.06.99)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE98/02979 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 8. Oktober 1998 (08.10.98) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 197 52 961.5 28. November 1997 (28.11.97) DE <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> FRAUNHOFER GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, D-80636 München (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> GÜTH, Achim [DE/DE]; Schillerstrasse 9, D-73119 Zell (DE). VOHRER, Uwe [DE/DE]; Kirschenweg 10/1, D-72076 Tübingen (DE). BERNHAGEN, Jürgen [DE/DE]; Friedrich-Schaal-Strasse 6, D-72074 Tübingen (DE). ELKINE, Bentsian [DE/DE]; Kaiserstrasse 8, D-70599 Stuttgart (DE). TOVAR, Günter [DE/DE]; Oberer Grundweg 25, D-70563 Stuttgart (DE). KÖLBLIN, Rüdiger [DE/DE]; Heerstrasse 84, D-70563 Stuttgart (DE). SCHÜLE, Andreas [DE/DE]; Hauptmannsreute 74, D-70193 Stuttgart (DE). VITZTHUM, Frank [DE/DE]; Adlerstrasse 53, D-71083 Herrenberg (DE).	<b>(74) Anwalt:</b> RÖSLER, Uwe; Landsberger Strasse 480 a, D-81242 München (DE). <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> CA, HU, IL, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
<b>(54) Title:</b> METHOD AND DEVICE FOR DISINTEGRATING BIOLOGICAL CELLS FOR THE PURPOSE OF EXTRACTING AND ANALYZING CELL CONTENTS		
<b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM AUFSCHLUSS BIOLOGISCHER ZELLEN ZUR EXTRAKTION UND ANALYSE DER ZELLINHALTE		
<b>(57) Abstract</b> <p>Disclosed is a method and a device for disintegrating biological cells for the purpose of extracting and analyzing the cell contents, especially nucleic acids. The invention is characterized in that the cells are exposed to an electric field and in that before or after being exposed to the electric field, the cells are brought into contact with substances supporting cell disintegration.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Beschrieben wird ein Verfahren sowie eine Vorrichtung zum Aufschluß biologischer Zellen zur Extraktion und Analyse der Zellinhalte, insbesondere Nukleinsäuren. Die Erfindung zeichnet sich dadurch aus, daß die Zellen einem elektrischen Feld ausgesetzt werden und daß vor oder nach dem Anlegen des elektrischen Feldes die Zellen mit Substanzen in Kontakt gebracht werden, die den Zellaufschluß unterstützen.</p>		



### **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

<b>AL</b>	Albanien	<b>ES</b>	Spanien	<b>LS</b>	Lesotho	<b>SI</b>	Slowenien
<b>AM</b>	Armenien	<b>FI</b>	Finnland	<b>LT</b>	Litauen	<b>SK</b>	Slowakei
<b>AT</b>	Österreich	<b>FR</b>	Frankreich	<b>LU</b>	Luxemburg	<b>SN</b>	Senegal
<b>AU</b>	Australien	<b>GA</b>	Gabun	<b>LV</b>	Lettland	<b>SZ</b>	Swasiland
<b>AZ</b>	Aserbaidshjan	<b>GB</b>	Vereinigtes Königreich	<b>MC</b>	Monaco	<b>TD</b>	Tschad
<b>BA</b>	Bosnien-Herzegowina	<b>GE</b>	Georgien	<b>MD</b>	Republik Moldau	<b>TG</b>	Togo
<b>BB</b>	Barbados	<b>GH</b>	Ghana	<b>MG</b>	Madagaskar	<b>TJ</b>	Tadschikistan
<b>BE</b>	Belgien	<b>GN</b>	Guinea	<b>MK</b>	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	<b>TM</b>	Turkmenistan
<b>BF</b>	Burkina Faso	<b>GR</b>	Griechenland	<b>ML</b>	Mali	<b>TR</b>	Türkei
<b>BG</b>	Bulgarien	<b>HU</b>	Ungarn	<b>MN</b>	Mongolei	<b>TT</b>	Trinidad und Tobago
<b>BJ</b>	Benin	<b>IE</b>	Irland	<b>MR</b>	Mauretanien	<b>UA</b>	Ukraine
<b>BR</b>	Brasilien	<b>IL</b>	Israel	<b>MW</b>	Malawi	<b>UG</b>	Uganda
<b>BY</b>	Belarus	<b>IS</b>	Island	<b>MX</b>	Mexiko	<b>US</b>	Vereinigte Staaten von Amerika
<b>CA</b>	Kanada	<b>IT</b>	Italien	<b>NE</b>	Niger	<b>UZ</b>	Usbekistan
<b>CF</b>	Zentralafrikanische Republik	<b>JP</b>	Japan	<b>NL</b>	Niederlande	<b>VN</b>	Vietnam
<b>CG</b>	Kongo	<b>KE</b>	Kenia	<b>NO</b>	Norwegen	<b>YU</b>	Jugoslawien
<b>CH</b>	Schweiz	<b>KG</b>	Kirgisistan	<b>NZ</b>	Neuseeland	<b>ZW</b>	Zimbabwe
<b>CI</b>	Côte d'Ivoire	<b>KP</b>	Demokratische Volksrepublik Korea	<b>PL</b>	Polen		
<b>CM</b>	Kamerun	<b>KR</b>	Republik Korea	<b>PT</b>	Portugal		
<b>CN</b>	China	<b>KZ</b>	Kasachstan	<b>RO</b>	Rumänien		
<b>CU</b>	Kuba	<b>LC</b>	St. Lucia	<b>RU</b>	Russische Föderation		
<b>CZ</b>	Tschechische Republik	<b>LI</b>	Liechtenstein	<b>SD</b>	Sudan		
<b>DE</b>	Deutschland	<b>LK</b>	Sri Lanka	<b>SE</b>	Schweden		
<b>DK</b>	Dänemark	<b>LR</b>	Liberia	<b>SG</b>	Singapur		
<b>EE</b>	Estland						

## Verfahren und Vorrichtung zum Aufschluß biologischer Zellen zur Extraktion und Analyse der Zellinhalte

### Beschreibung

#### **Technisches Gebiet**

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren sowie eine Vorrichtung zum Aufschluß von biologischen Zellen zur Extraktion und Analyse ihrer Zellinhalte, insbesondere der Nukleinsäuren.

Für die Untersuchung biologischer Zellen und insbesondere der Analyse der Zellinhalte, insbesondere Proteine und Nukleinsäuren (DNA und RNA), beispielsweise zu Zwecken medizinischer Diagnostik, müssen die Zellwände und Membranen aufgeschlossen werden, um das Zellinnere in einer geeigneten Form aus den Zellen extrahieren zu können.

#### **Stand der Technik**

Hierzu sind eine Reihe bekannter Verfahren geeignet, die in dem Beitrag von Carl A. Schnaitman, "Cell Fractionation" in Manual of Methods for General Bacteriology, American Society for Mikrobiology, Washington, DC 20006, 1981, Chapter 5, Seite 52-61, in einer Übersichtsdarstellung beschrieben sind. Die in diesem Beitrag beschriebenen Methoden lassen sich in unterschiedliche Gruppen einteilen, die sich nach ihrer Art der Zellwandzerstörung bzw. -auflösung unterscheiden:

Mechanische Verfahren beruhen auf der Erzeugung lokaler Druckschwankungen am Ort der aufzuschließenden Zellen, wodurch Zellwände und Membranen regelrecht aufgebrochen werden. Aufgrund der für die Zellwandzerstörung notwendigen starken Druckschwankungen bedarf es jedoch entsprechend stabil ausgebildeter Vorrichtungen, wie sie beispielsweise in dem Artikel von J.R. Raper und E.A. Hyatt, "Modified Press For Disruption Of Microorganisms", J. of Bacteriology, V. 85, S. 712-

713, beschrieben sind. Weitere Vorrichtungen zur Erzeugung derartig großer Druck- oder Scherkräfte sind sogenannte Kugelmøhlen oder die sogenannte French press, die in "Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology", American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1986 in Kapitel 9.3.6. auf Seiten 103-104 dargestellt sind.

Die vorstehend genannten Vorrichtungen bedürfen neben einen sehr großen technischen und mechanischen Aufwand, der betrieben werden muß, um derartig große Druckkräfte zu erzeugen und sicher zu beherrschen, viel Platz und lassen sich überdies schwer automatisieren. Ein weiterer Nachteil der bekannten Druckbehandlung biologischer Zellen besteht überdies auch darin, daß die Zellinhalte, hierbei sind insbesondere die langkettigen DNA-Moleküle gemeint, stark fragmentiert werden, so daß eine vollständige DNA-Analyse erschwert ist.

Auch sind Ultraschall-Aufschlußmethoden bekannt, bei denen die Zellwände und Membranen durch Kavitationseffekte regelrecht aufgerissen wird, so daß das Zellinnere nach außen gelangen kann. Beim Ultraschallaufschluß wird jedoch eine erhebliche Schall-Leistung in der zu untersuchenden Probe dissipiert, wodurch die Probe unnötigerweise erwärmt wird. Kühlvorkehrungen sind daher nötig. Durch die auftretenden Temperaturschwankungen ist jedoch eine einigermaßen genaue Prozeßführung erschwert. Überdies sind die bekannten Apparaturen zur Anwendung des Hochleistungsultraschalls schwierig zu reinigen, wodurch die Gefahr der Querkontamination nicht ausgeschlossen werden kann.

Der Aufschluß von biologischen Zellen auf ausschließlich chemischem Wege bedarf individuell auf die Zellen angepaßten Chemikalien, wodurch bei der Untersuchung unbekannter Zelltypen, wie es beispielsweise bei der Diagnose unbekannter Krankheitserreger der Fall ist, die Schwierigkeit der Wahl der jeweils richtigen Chemikalie besteht. Ein Beispiel für ein Zellaufschlußverfahren unter ausschließlicher Verwendung rein chemisch ablaufender Aufschlußreaktionen ist in "Molecular Cloning – A Laboratory Manual", Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 1.25-1.31 beschrieben. Die für den Aufschluß von Zellen erforderlichen Reaktionszeiten bei ausschließlicher Verwendung von Chemikalien betragen mehrere Stunden trotz hohen Konzentrationen der dabei

verwendeten Chemikalien, die zudem bei anschließenden Analyseschritten, wie beispielsweise PCR-Reaktionen, störende Einflüsse haben können. Auch ist die Aufschlußrate bei einigen Mikroorganismen nicht ausreichend; es ist beispielsweise extrem schwierig bei *Micrococcus luteus* auf dem chemischen Wege eine Rate höher als 20% zu erreichen.

Schließlich sind Verfahren bekannt, bei denen in flüssigen Medien suspendierte biologische Zellen, wie beispielsweise Bakterien oder Pilze, einem starken elektrischen Feld ausgesetzt werden. So werden mittels elektrischer Felder biologische Zellen im Wege der Pasteurisierung und Sterilisation abgetötet, wie es beispielsweise in der Druckschrift US 5 235 905 beschrieben ist. Hierbei wird, um einen zu großen Energieeintrag in die Probe und dessen Überhitzung zu vermeiden, die Probe mit gepulsten elektrischen Feldern beaufschlagt mit jeweils Impulsdauern von einigen Mikrosekunden. Da eine biologische Zelle elektrisch betrachtet aus einem elektrolytischen und deshalb elektrisch leitenden Inhalt besteht, der von einer elektrisch isolierenden Membran umschlossen ist, verschieben sich die elektrischen Ladungsträger im Inneren beim Anlegen eines elektrischen Feldes von außen. Auf diese Weise entstehen lokale Potentialdifferenzen zwischen dem Zellinneren und Zelläußeren, die dazu führen, daß die Zellmembran einen elektrischen Durchbruch erfährt, wodurch sie ihre semipermeablen Eigenschaften verliert und an elektrischer Leitfähigkeit zunimmt. Bei geringen äußeren Feldstärken sowie kurzen Impulsdauern ist die Veränderung der elektrischen Leitfähigkeit der Zellmembran reversibel, eine Erscheinung, die bei der Elektroporation (siehe hierzu E. Neumann, A.E. Sowers, C.A. Jordan, "Electroporation and Electrofusion in Cell Biology", Plenum Press, New York, 1989) eine zentrale Rolle spielt. Die wird beispielsweise benutzt, um genetisches Material in die Zellen zu bringen. Nachteilig bei dieser Anwendung der Elektroporation ist, daß typischerweise die Effizienz im Bereich von 0,01% liegt, d.h. nur in eine Zelle aus 10000 das Material auch tatsächlich hineingebracht wird.

Bei stärkeren Feldern und ausreichender Impulsdauer, insbesondere bei einer wiederholten Behandlung der biologischen Zellen, sind diese Änderungen permanent und führen letztendlich zum Zelltod. Diese Vorgehensweise wird standardmäßig zur Abtötung von Mikroorganismen in Lebensmitteln eingesetzt.

In der DE 35 37 261 A1 ist ein Verfahren zum feldinduzierten Einschleusen von Makromolekülen in lebenden Zellen beschrieben, das einen zum gezielten Ausschleusen von Zellinhalte reziproken Vorgang darstellt und somit anderen Prozeßbedingungen unterworfen ist. So können das Ein- und Ausschleusen von Teilchen in Zellen nicht als äquivalente Vorgänge angesehen werden, zumal die Natur des Transportes asymmetrisch ist.

Der asymmetrische bzw. gerichtete Transport von verschiedenen Stoffen durch die Zellwand gehört vielmehr zu den wichtigsten Funktionen der Zellmembran. So weist zum einen die Zellmembran einen asymmetrischen Aufbau auf, zum anderen unterscheidet sich der Zellinhalt wesentlich von der äußeren Umgebung der Zelle. Die Größe der transportierten Molekülen ist oftmals mit der Zellgröße selbst vergleichbar, wodurch nicht zuletzt auch dadurch die unterschiedlichen Transportmechanismen, die dem Ein- und Ausschleusen zugrunde liegen, nicht durch einfache Diffusionsmodelle beschrieben werden können - wobei auch die einfache Diffusion kein rein symmetrischer Prozeß ist. Die Transportmechanismen sind kompliziert, beinhalten mehrere Schritte und sind für die jeweilige Transportrichtung sehr spezifisch.

Gleiches gilt auch für das aus der JP 04173093 A hervorgehende Transformationsverfahren von *Bacillus stearothermophilus* mit einem Plasmid.

Allen bekannten Verfahren zum Aufschluß biologischer Zellen haftet neben dem zum Teil sehr großen apparativen und technischen Aufwand der Nachteil an, daß die Verfahren nicht vollautomatisch durchzuführen sind. Zudem kommt, daß die Zellaufschlußrate nicht immer ausreichend groß ist.

### **Darstellung der Erfindung**

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zum Aufschluß biologischer Zellen zur Extraktion und Analyse der Zellinhalte derart weiterzubilden, daß das Verfahren vollautomatisch und ohne großen apparativen und technischen Aufwand ablaufen kann. Insbesondere soll der extrahierte Anteil der zu analysierenden Zellinhalte unabhängig vom Zelltyp hoch sein, wobei die Verfahrenszeitdauer zur Extraktion und Isolation der Zellinhalte deutlich reduziert werden soll. Überdies soll

eine Vorrichtung angegeben werden, mit der eine kostengünstige, schnelle und sichere Durchführung des Verfahrens möglich ist.

Erfindungsgemäß ist erkannt worden, daß die Nachteile, die bei den bekannten Verfahren des ausschließlichen chemischen Aufschlusses von biologischen Zellen auftreten, durch eine gezielte Abfolge bzw. Überlagerung von elektrischer und chemischer Behandlung von biologischen Zellen vermieden werden können.

Erfindungsgemäß zeichnet sich das Verfahren zum Aufschluß biologischer Zellen zur Extraktion und Analyse der Zellinhalte dadurch aus, daß die Zellen einem elektrischen Feld ausgesetzt werden und daß die Zellen vor oder nach dem Anlegen des elektrischen Feldes mit einer Substanz in Kontakt gebracht werden, die den Zellaufschluß unterstützt.

Die für gewöhnlich in einem flüssigen Medium suspendierten biologischen Zellen werden einem gepulst betriebenen elektrischen Feld mit typischen Feldstärken zwischen 5 und 100 kV/cm und einer Pulslänge von ca. 0,5 bis 50 Mikrosekunden ausgesetzt. Ebenso können die Zellen auch in Zellverbänden, wie etwa Gewebestücken vorliegen oder auf einem Träger immobilisiert aufgebracht sein, bspw. auf einem Filter.

Durch die Einwirkung des elektrischen Feldes und den elektrischen Durchbruch entstehen in den Lipidschichten, aus den die Zellmembran besteht, Poren. Da sie aber sehr klein sind, und da bei bestimmten Zelltypen neben der Zellmembran auch die Zellwand die Diffusion von großen Molekülen wie beispielweise Nukleinsäure hindern kann, reicht die Behandlung der Zellen mit elektrischem Feld alleine für die Freisetzung der Zellinhalte in vielen Fällen nicht aus.

Es wird erfindungsgemäß vorgeschlagen, das Entstehen der Poren in der Zellmembran auszunutzen, um die Wirkung von Chemikalien zum Zellaufschluß zu unterstützen und zu beschleunigen.

In einer Variante werden Chemikalien verwendet, die auf den Zellinhalt und insbesondere auf die zu analysierende Moleküle so einwirken, daß sie leichter und

schnelle freigesetzt werden. Diese Chemikalien diffundieren durch die durch elektrische Behandlung entstandene Poren in das Zellinnere, und bauen beispielweise Proteine ab und schneiden gezielt DNA-Moleküle in kleinere Fragmente, die aber für nachfolgende DNA-Analyse geeignet sind. Die entstandene DNA-Fragmente können dann ungehindert durch die Poren nach außen diffundieren. Diese Prozesse werden durch Zugabe einer oberflächenaktiven Substanz (Detergenz), wie beispielweise Natriumdodecylsulfat (SDS), unterstützt.

In einer anderen Variante wird die Tatsache ausgenutzt, daß die durch elektrische Behandlung entstandene Poren schwache Stellen darstellen, die den Angriff der Chemikalien auf die Membran wesentlich erleichtern und beschleunigen. Chemikalien, die zum vollständigen Abbau der Zellwände eingesetzt werden können, sind beispielweise chaotrope Reagenzien wie Harnstoff, Guanidiniumhydrochlorid oder -thiocyanat und andere. Es kann auch Dimethylsulfoxid eingesetzt werden.

Da die in einem Medium suspendierten biologischen Zellen einem elektrischen Feld ausgesetzt sind, bedarf es bei der Beimengung der zusätzlich chemischen Substanz keiner allzu hohen Konzentration, wodurch negative Auswirkungen, bedingt durch die Gegenwart der chemischen Substanz, bei nachfolgenden Analyseschritten ausgeschlossen werden können.

Um die angestrebte chemische Wirkung zu optimieren und zu beschleunigen, werden die in Kontakt mit den Chemikalien gebrachte Zellen, beispielweise in Form einer Zellsuspension, auf ein Temperaturniveau zwischen 35 und 100°C gebracht.

Zur Durchführung des Verfahrens ist erfindungsgemäß eine Vorrichtung dadurch ausgebildet, daß ein, die in einem Medium suspendierten Zellen oder Zellverbände aufnehmendes Probenvolumen mit zwei flächig ausgebildeten, sich gegenüberliegenden Elektroden vorgesehen ist, das durch ein Deckelelement, dessen dem Probenvolumen zugewandte Seite konvex ausgebildet ist, an der Oberseite des Probenvolumens abschließbar ist. Durch das konvex ausgebildete Deckelelement kann vorteilhafterweise vermieden werden, daß bei einem Einschluß des flüssigen Mediums innerhalb des Probenvolumens keine Luftblasen eingeschlossen werden, die zur ungleichmäßigen Verteilung des elektrischen Feldes

und daher möglicherweise zu unerwünschten elektrischen Durchbrüchen in der Behandlungsvorrichtung führen würden..

### **Kurze Beschreibung der Zeichnungen**

Die Erfindung wird nachstehend ohne Beschränkung des allgemeinen Erfindungsgedankens anhand von Ausführungsbeispielen unter Bezugnahme auf die Zeichnungen exemplarisch beschrieben. Es zeigen:

Fig. 1 Ausführungsbeispiel einer Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens zum Aufschluß biologischer Zellen,

Fig. 2 alternative Vorrichtung mit metallischer Folie am Deckelelement,

Fig. 3 alternatives Ausführungsbeispiel mit metallischer Trennfolie innerhalb des Probenvolumens, sowie

Fig. 4 alternatives Ausführungsbeispiel mit Reibelementen zur Gewebezerkleinerung.

### **Kurze Beschreibung eines Ausführungsbeispiels**

In Fig. 1 ist eine vorteilhafte Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens zum Aufschluß biologischer Zellen dargestellt, die eine Behandlungszelle zeigt, die ein Kunststoffgehäuse 2 aufweist, in das eine untere Elektrode 3 eingegossen ist und eine obere Elektrode 4 vorsieht, die zugleich das Deckelelement darstellt. Zwischen den Elektroden befindet sich im Probenvolumen 1 die in einer Lösung suspendierten aufzuschließenden biologischen Zellen. Alternativ können sich die Zellen immobilisiert auf einem Träger, beispielweise einem Filter, befinden, wobei das Restvolumen der Vorrichtung mit einer Elektrolytlösung aufgefüllt wird. Durch die konvex gewölbte Oberfläche des Deckelelementes 4 wird gewährleistet, daß beim Aufsetzen des Deckelelementes keine Luftblasen im Probenvolumen 1 eingeschlossen werden. Der beim Aufsetzen des Deckelelementes auf das Probenvolumen 1 durch das Deckelelement 1 verdrängte Überschuß der Suspension 5 sammelt sich in einer zirkular um das Deckelelement 4 vorgesehenen Vertiefung 6

des Kunststoffgehäuses 2. Die dem Deckelelement 4 gegenüberliegende untere Elektrode 3 ist hingegen konkav ausgebildet, so daß der Abstand zwischen beiden Elektroden konstant gewählt ist. Zudem erleichtert die Ausgestaltung der Elektrodenform das Einfüllen einer Flüssigkeit in das Probenvolumen 1 ohne Luftblasen sowie eine weitgehend restlose Probenentnahme, nach Durchführung des Zellaufschlußverfahrens.

Um die Elektroden 4 und 3 zu kontaktieren sowie die Behandlungszellenteile insbesondere in einer automatisierten Vorrichtung zu transportieren und zu fixieren, weist die untere Elektrode 3 einen Stecker 7 sowie die obere Elektrode 4 eine Vertiefung 8 auf.

Der in dem Ausführungsbeispiel vorzugsweise eingestellte Elektrodenabstand beträgt 2 bis 5 mm, der Elektrodendurchmesser ca. 1 cm. Bei diesen Abmessungen und bei einer noch relativ leicht handhabbaren Spannung von ca. 20 kV beträgt die Stärke des elektrischen Feldes zwischen 40 und 100 kV/cm, eine Feldstärke, die für einen Zellaufschluß durchaus geeignet ist.

Die Elektrodenoberflächen können vorzugsweise aus Aluminium gefertigt sein, da dieses Material biologisch inert und chemisch ausreichend beständig ist. Außerdem ist es leicht zu verarbeiten und billig, und daher insbesondere für Einwegartikel geeignet.

Nach der Behandlung mit elektrischem Feld kann die chemische Behandlung im gleichen Volumen durch Hinzugabe der Chemikalien fortgesetzt werden, oder alternativ kann die Zellsuspension in ein anderes Gefäß umpipettiert werden.

Die in Fig. 1 dargestellte Ausführungsform mag durch die konstruktive Auslegung des Deckelelementes für eine Probenentnahme umständlich sein, da das Deckelelement vor dem Entleeren des Probenvolumens 1 zu entfernen ist, an dem ein wesentlicher Teil der Lösung als Tropfen hängenbleiben kann. Dies wiederum könnte zu der Kontamination des Umfeldes und somit zur Querkontamination weiterer Proben führen, die es jedoch gilt, insbesondere bei der automatischen Handhabung derartiger Proben, zu vermeiden.

Um die Probenentnahme insbesondere in einer automatisierten Vorrichtung zu erleichtern und sicher gegenüber Querkontamination zu machen, sieht die Vorrichtung gemäß Ausführungsbeispiel der Figur 2 eine zweiteilige Ausgestaltung des Deckelelementes 4 vor. Das Deckelelement 4 verfügt über eine mittige Bohrung 9 und ist mit einer das Deckelelement 4 umhüllenden elektrisch leitenden, vorzugsweise aus Aluminium gefertigten Folie 10 umhüllt. Nach der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird durch den Kanal 9 eine Pipette eingeführt, die die Folie 10 durchstößt, so daß die im Probenvolumen 1 enthaltene Suspension abgesaugt werden kann. Zwar muß in diesem Ausführungsbeispiel die Folie jedes Mal ausgetauscht werden, doch erscheint dies vorteilhaft, zumal zur Vermeidung von Querkontaminationen die gesamte Behandlungszelle als Einwegartikel ausgebildet werden kann.

In Fig. 3 ist ein weiteres Ausführungsbeispiel dargestellt, das ein Deckelelement 4 vergleichbar zur Ausführungsform gemäß Fig. 1 aufweist. Jedoch sieht diese Ausgestaltung eine das Probenvolumen 1 abtrennende Metallfolie 11 vor, die zugleich die untere Elektrode darstellt. Unter der Elektrode 11 befindet sich ein Hohlraum 12, der mit einem Kanal 7 verbunden ist. Wie im Ausführungsbeispiel gemäß Fig. 1 wird die Behandlungszelle mit einer Suspension von biologischen Zellen aufgefüllt und eine Hochspannungsbehandlung mit chemischen Additiven zum Zellaufschluß durchgeführt.

Nach Abschluß der elektrischen Feldapplikation wird durch den Kanal 7 der Hohlraum 12 evakuiert. Infolge der Druckdifferenz reißt die Folie 11 auf, so daß die behandelte Suspension zur weiteren Analyse durch den Kanal 7 abgesaugt werden kann.

Diese Ausführungsvariante eignet sich insbesondere für eine vollautomatische Verfahrensdurchführung, bei der die Gefahr der Querkontaminationen vollständig ausgeschlossen werden können.

In allen beschriebenen Fällen ist eine chemische Nachbehandlung notwendig, um effizient die Zellinhalte nach außen zu bringen. Die Chemikalien können der Lösung

vor der elektrischen Feldapplikation zugesetzt werden; da sie aber in vielen Fällen Elektrolyten sind bzw. in elektrolytischen Puffern optimal wirken, sollen sie dann erst nach Abschluß der elektrischen Feldapplikation der Zellsuspension hinzugefügt werden.

In einer Variante der chemischen Behandlung wird der Zellsuspension eine Mischung aus 15 verschiedenen Restriktionsendonukleasen (je 3 U/ml) hinzugefügt, und bei 37°C ca. 10 bis 30 Minuten inkubiert. Die Reagenzien diffundieren durch die bei der elektrischen Feldapplikation entstandenen Membranporen in das Zellinnere und zerschneiden gezielt die DNA-Stränge auf Stücke mit einigen Tausend Basenpaaren, die später für PCR-Reaktion verwendet werden können. Nach der Behandlung wird der Suspension Proteinase K in einer Konzentration von 1 µg/ml hinzugefügt, und das Temperaturniveau wird auf 60°C eingestellt. Proteinase K diffundiert gleichfalls durch die Poren und bewirkt die Lyse sowohl von Zellproteinen als auch der im vorherigen Schritt hinzugefügten Enzymen, so daß störende Einflüsse auf die nachfolgenden PCR-Reaktionen ausgeschlossen werden. Nach Inkubation von 10 bis 30 Min. bei 60°C wird die Temperatur auf 95°C gebracht. Dabei denaturiert die Proteinase K, und die DNA diffundiert durch die Poren in der Membran nach außen. Durch derartige Behandlung werden die PCR-Inhibitoren, sowohl hinzugefügte als auch zelleigene, weitgehend abgebaut.

In einer anderen Variante der chemischen Behandlung wird nach Abschluß der elektrischen Feldapplikation der Zellsuspension Guanidiniumhydrochlorid bzw. -thiocyanat (GdnHCl bzw. GdnSCN) hinzugefügt, so daß eine 0,3 bis 3 M Konzentration eingestellt wird. Die Suspension wird auf eine Temperatur von 60 bis 100°C gebracht und 10 bis 30 Min inkubiert. Dadurch werden die Zellwände und Membranen zerstört, wodurch die DNA freigesetzt wird. Diese Methode ist einfacher als die oben beschriebene, hat aber den Nachteil, daß Guanidiniumverbindungen, die zwar in einer geringeren Konzentration als sonst für rein chemischen Zellaufschluß verwendet werden, die nachfolgende PCR-Reaktion inhibieren können und deswegen aus der Lösung entfernt werden müssen.

In der Ausführungsform gemäß Fig. 4 sind an den Oberseiten der Elektroden 13 und 3 Oberflächenrauigkeiten vorgesehen, durch die in das Probenvolumen 1 eingebrachte Gewebestücke 16 zerkleinert werden können.

Die obere Elektrode 13 und das Gehäuse 2 sind gemäß Ausführungsbeispiel der Figur 4 derart ausgeführt, daß die Elektrode 13 axial und rotationsbeweglich geführt ist. Das Restvolumen des Probenvolumens 1 wird mit einer Flüssigkeit 17 aufgefüllt und die Gewebeprobe 16 durch einen Druck auf die obere Elektrode 13 zwischen den Elektroden zusammengepreßt. In diesem Fall ist die Flüssigkeit nur notwendig, um elektrische Entladungen zwischen den Elektroden auszuschließen, da die Probe selbst die Elektroden direkt kontaktiert. Die zwischen die Elektrode eingebrachte Flüssigkeit ist daher nicht unbedingt elektrisch leitend, so daß reines Wasser oder auch Öl verwendet werden kann.

Nach der Hochspannungsbehandlung und der Zugabe entsprechender chemischer Additive wird die Gewebeprobe 16 durch Anlegen eines starken Druckes an die obere Elektrode 13, eventuell kombiniert mit Rotationsbewegungen zerquetscht. Die obere Elektrode 13 und das Gehäuse 2 mit der unteren Elektrode 3 spielen also die Rolle eines Stempels und einer Matrize. Vorzugsweise weisen die Elektrodenoberflächen ein rauhes Profil 17 auf, um die Desintegration des Gewebes effizienter zu machen.

Die dabei freigesetzte Flüssigkeit bzw. der sich bildende Brei, der die Nukleinsäuren enthält, steigt in den Spalt 14 zwischen der oberen Elektrode 13 und dem Gehäuse 2 auf und kann durch den Kanal 15 zur weiteren Analyse abgesaugt werden.

**BEZUGSZEICHENLISTE**

- 1      Behandlungsraum (wird mit dem zu behandelnden biologischen Material  
im entsprechenden Medium (Elektrolytlösung) befüllt)
- 2      Gehäuse / Kapsel
- 3      Untere Elektrode
- 4      Deckel
- 5      Mediumüberschuß
- 6      Vertiefung / Rinne dafür
- 7      Stecker
- 8      Bohrung für Elektrodenanschluß
- 9      Kanal im Deckel
- 10     Metallfolie auf dem Deckel
- 11     Untere Elektrode aus Metallfolie
- 12     Hohlraum
- 13     Obere Elektrode
- 14     Spalt
- 15     Kanal im Gehäuse
- 16     Gewebeprobe
- 17     Flüssigkeit

### PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Aufschluß biologischer Zellen zur Extraktion und Analyse der Zellinhalte,  
dadurch **gekennzeichnet**, daß die Zellen einem elektrischen Feld ausgesetzt werden und  
daß vor oder nach dem Anlegen des elektrischen Feldes die Zellen mit Substanzen in Kontakt gebracht werden, die den Zellaufschluß unterstützen.
2. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch **gekennzeichnet**, daß das elektrische Feld ein gepulstes Feld mit einer Feldstärke über 5 kV/cm, bevorzugt über 20 kV/cm und mit einer Pulsdauer etwa 0,5 bis 50 Mikrosekunde ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2,  
dadurch **gekennzeichnet**, daß etwa 1 bis 100 Feldpulse an die Zellen angelegt werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,  
dadurch **gekennzeichnet**, daß die Zellen im Gewebeverband oder auf einem Träger, bevorzugt einem Filter, vorliegen.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,  
dadurch **gekennzeichnet**, daß die Zellen in einem elektrisch leitenden Medium suspendiert werden.
6. Verfahren nach Anspruch 5,  
dadurch **gekennzeichnet**, daß das Medium, in dem die Zellen suspendiert sind einen spezifischen elektrischen Widerstand von 20 bis 200 Ohm-m aufweist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,

dadurch **gekennzeichnet**, daß die Substanz ein Detergenz, eine Nuklease oder eine Protease ist.

8. Verfahren nach Anspruch 7,

dadurch **gekennzeichnet**, daß das Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) ist.

9. Verfahren nach Anspruch 7,

dadurch **gekennzeichnet**, daß die Protease Proteinase K ist

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,

dadurch **gekennzeichnet**, daß die Substanz Dimethylsulfoxid (DMSO) ist.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,

dadurch **gekennzeichnet**, daß die Substanz Guanidiumthiocyanat oder -hydrochlorid (GdnSCN oder GdnHCl) ist.

12. Verfahren nach Anspruch 11,

dadurch **gekennzeichnet**, daß die Guanidinium-Verbindung eine Konzentration von über 0,2 M aufweist.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 12,

dadurch **gekennzeichnet**, daß das Medium einer Temperatur zwischen 35 und 100°C ausgesetzt wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13,

dadurch **gekennzeichnet**, daß die aufzuschließenden Zellinhalte Nukleinsäuren sind.

15. Vorrichtung zum Aufschluß biologischer Zellen zur Extraktion und Analyse der Zellinhalte, zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch **gekennzeichnet**, daß ein, die in einem Medium suspendierten Zellen, Zellverbände in Form eines Gewebeverbandes oder auf einem Träger aufgebrachte Zellen aufnehmendes Probenvolumen mit zwei flächig ausgebildeten, sich gegenüberliegenden Elektroden vorgesehen ist, das durch ein Deckelelement,

dessen dem Probenvolumen zugewandte Seite konvex ausgebildet ist, an der Oberseite des Probenvolumens abschließbar ist.

16. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch **gekennzeichnet**, daß das Deckelelement als Elektrode ausgebildet ist.

17. Vorrichtung nach Anspruch 16, dadurch **gekennzeichnet**, daß die dem Deckelelement gegenüberliegende Elektrode eine dem Probenvolumen zugewandte konkav ausgebildete Seite aufweist.

18. Vorrichtung nach Anspruch 16 oder 17, dadurch **gekennzeichnet**, daß das Deckelelement eine Durchgangsöffnung zum Probenvolumen aufweist und an der dem Probenvolumen zugewandten Seite mit einer elektrisch leitenden Folie überzogen ist.

19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch **gekennzeichnet**, daß die dem Deckelelement gegenüberliegende untere Elektrode als Folie ausgebildet ist, die das Probenvolumen von einem unter der Folie befindlichen Abflußkanal trennt.

20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch **gekennzeichnet**, daß das Deckelelement als Stempel ausgebildet ist, der axial und rotatorisch beweglich innerhalb des Probenvolumens führbar ist.

21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 20, dadurch **gekennzeichnet**, daß die dem Probenvolumen zugewandten Flächen der Elektroden aufgerauht sind.

22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 21, dadurch **gekennzeichnet**, daß die Elektroden etwa 1 bis 5 mm voneinander beabstandet sind.

1/2

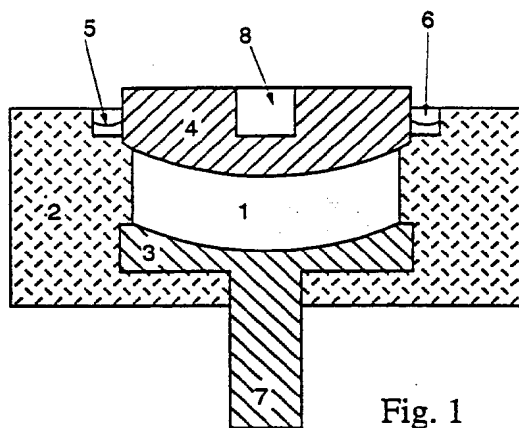


Fig. 1

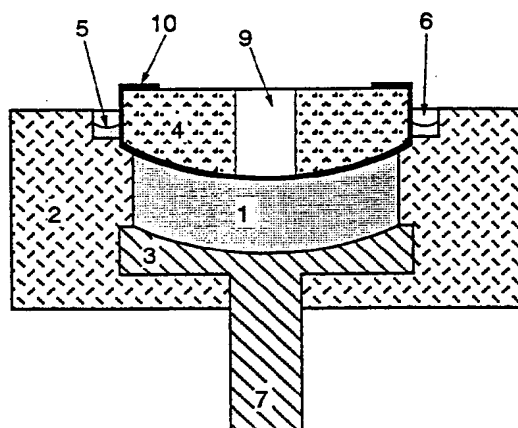


Fig. 2

2/2

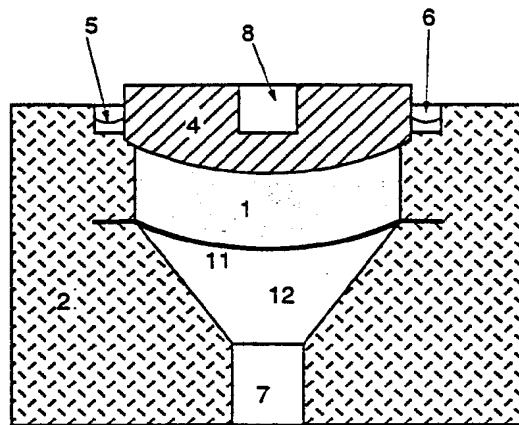


Fig. 3

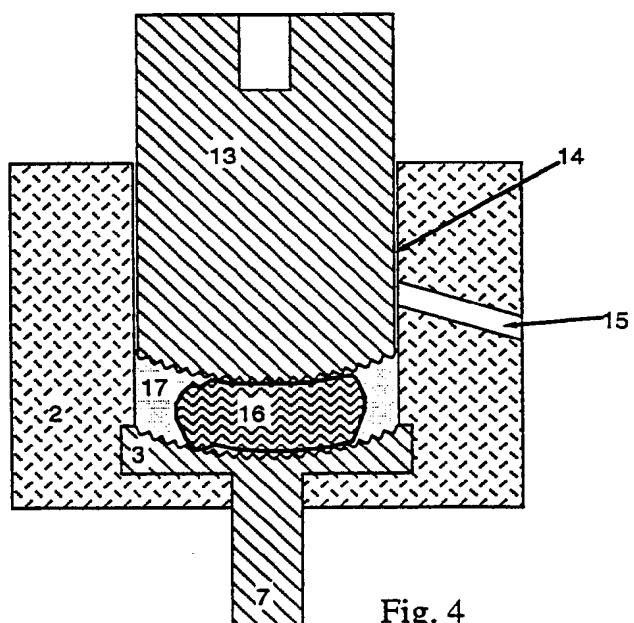


Fig. 4

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 98/02979

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/483 C12M1/00 G01N1/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	W0 94 26867 A (ABBOTT LAB) 24 November 1994	1,3-5, 7-9,13, 14
A	see abstract; claims ---	15-22
Y	W0 91 18103 A (SCIENT EQUIPMENT DESIGN & DEV) 28 November 1991	1,3-5, 7-9,13, 14
A	see page 3, line 24 - page 8, line 34; figures ---	15-22
A	EP 0 710 718 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE) 8 May 1996 see page 5, line 33 - page 11, line 59; figures --- -/--	1-22

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 April 1999

Date of mailing of the international search report

29/04/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bosma, R

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE 98/02979

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 37 33 927 A (CIBA GEIGY AG) 14 April 1988 see column 4, line 69 - column 8, line 39; figures -----	1-22
A	EP 0 128 566 A (KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH) 19 December 1984 see abstract; figures 1,2 -----	15

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int lional Application No

PCT/DE 98/02979

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9426867 A	24-11-1994	AU 6776994 A CA 2161337 A EP 0698082 A JP 8510004 T	12-12-1994 24-11-1994 28-02-1996 22-10-1996
WO 9118103 A	28-11-1991	BE 1004328 A AU 7772291 A	03-11-1992 10-12-1991
EP 0710718 A	08-05-1996	US 4822470 A US 4970154 A AU 2787989 A CA 1340200 A DE 3855330 D DE 3855330 T EP 0386086 A JP 2739978 B JP 3502043 T WO 8903426 A US 5304486 A	18-04-1989 13-11-1990 02-05-1989 15-12-1998 04-07-1996 21-11-1996 12-09-1990 15-04-1998 16-05-1991 20-04-1990 19-04-1994
DE 3733927 A	14-04-1988	CH 668984 A AU 8078087 A WO 8802777 A	15-02-1989 06-05-1988 21-04-1988
EP 0128566 A	19-12-1984	DE 3321239 A JP 60012969 A	13-12-1984 23-01-1985

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/02979

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 G01N33/483 C12M1/00 G01N1/28

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G01N C12M

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 94 26867 A (ABBOTT LAB) 24. November 1994	1,3-5, 7-9,13, 14
A	siehe Zusammenfassung; Ansprüche ---	15-22
Y	WO 91 18103 A (SCIENT EQUIPMENT DESIGN & DEV) 28. November 1991	1,3-5, 7-9,13, 14
A	siehe Seite 3, Zeile 24 - Seite 8, Zeile 34; Abbildungen ---	15-22
A	EP 0 710 718 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE) 8. Mai 1996 siehe Seite 5, Zeile 33 - Seite 11, Zeile 59; Abbildungen ---	1-22
	--- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. April 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

29/04/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bosma, R

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/02979

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 37 33 927 A (CIBA GEIGY AG) 14. April 1988 siehe Spalte 4, Zeile 69 - Spalte 8, Zeile 39; Abbildungen -----	1-22
A	EP 0 128 566 A (KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH) 19. Dezember 1984 siehe Zusammenfassung; Abbildungen 1,2 -----	15

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/02979

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9426867 A	24-11-1994	AU 6776994 A CA 2161337 A EP 0698082 A JP 8510004 T	12-12-1994 24-11-1994 28-02-1996 22-10-1996
WO 9118103 A	28-11-1991	BE 1004328 A AU 7772291 A	03-11-1992 10-12-1991
EP 0710718 A	08-05-1996	US 4822470 A US 4970154 A AU 2787989 A CA 1340200 A DE 3855330 D DE 3855330 T EP 0386086 A JP 2739978 B JP 3502043 T WO 8903426 A US 5304486 A	18-04-1989 13-11-1990 02-05-1989 15-12-1998 04-07-1996 21-11-1996 12-09-1990 15-04-1998 16-05-1991 20-04-1990 19-04-1994
DE 3733927 A	14-04-1988	CH 668984 A AU 8078087 A WO 8802777 A	15-02-1989 06-05-1988 21-04-1988
EP 0128566 A	19-12-1984	DE 3321239 A JP 60012969 A	13-12-1984 23-01-1985